


 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)
Internationale Patentklassifikation⁶:

C12N 15/82, C12Q 1/68, A01H 5/00

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/49823

(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum:

31. Dezember 1997 (31.12.97)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/03187

(22) Internationales Anmeldedatum: 18. Juni 1997 (18.06.97)

(30) Prioritätsdaten:

196 25 330.6	25. Juni 1996 (25.06.96)	DE
196 25 347.0	25. Juni 1996 (25.06.96)	DE
196 35 569.9	2. September 1996 (02.09.96)	DE
196 54 574.9	27. Dezember 1996 (27.12.96)	DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): GSF - FORSCHUNGSZENTRUM FÜR UMWELT UND GESUNDHEIT GMBH [DE/DE]; Ingolstädter Landstrasse 1, D-85764 Oberschleißheim (DE). BAYER AG [DE/DE]; D-51368 Leverkusen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHUBERT, Roland [DE/DE]; Dachauer Strasse 479, D-80993 München (DE). SANDERMANN, Heinrich [DE/DE]; Rottenbucherstrasse 36, D-81377 München (DE). ERNST, Dietrich [DE/DE]; Am Schloßpark 28, D-82131 Gauting (DE). HAIN, Rüdiger [DE/DE]; Talstrasse 53a, D-40764 Langenfeld (DE). FISCHER, Regina [DE/DE]; Stockdorferstrasse 50, D-81475 München (DE).

(74) Anwalt: MAIWALD, Walter; Maiwald & Partner, Poccistrasse 11, D-80336 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: OZONE-INDUCED GENE EXPRESSION IN PLANTS

(54) Bezeichnung: OZON-INDUZIERTER GENEXPRESSION IN PFLANZEN

(57) Abstract

The present invention relates to new DNA sequences, a method for producing new plants which contain a new DNA sequence, the coding sequence thereof being expressed after ozone induction. The invention also relates to said new plants and the use of DNA sequences to produce ozone-responsive gene expression in plants and plant cells. Moreover, it relates to a new promoter, the specificity thereof being increased by removal of the ozone response capacity thereof.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft neue DNA-Sequenzen, eine Methode zur Erzeugung neuer Pflanzen, die eine neue DNA-Sequenz enthalten, deren kodierende Sequenz nach Ozon-Induktion exprimiert wird, diese neuen Pflanzen sowie die Verwendung der DNA-Sequenzen zur Erzeugung Ozon-responsiver Genexpression in Pflanzen und Pflanzenzellen. Andererseits betrifft die vorliegende Erfindung einen neuen Promotor, dessen Spezifität durch Beseitigung seiner Ozon-Responsivität erhöht ist.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swaailand
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Ozon-Induzierte Genexpression in Pflanzen

5 Die vorliegende Erfindung betrifft neue DNA-Sequenzen, eine
Methode zur Erzeugung neuer Pflanzen, die eine neue DNA-Sequenz
enthalten, deren kodierende Sequenz nach Ozon-Induktion expri-
miert wird, diese neuen Pflanzen sowie die Verwendung der DNA-
Sequenzen zur Erzeugung Ozon-responsiver Genexpression in
10 Pflanzen und Pflanzenzellen. Andererseits betrifft die vorlie-
gende Erfindung einen neuen Promotor, dessen Spezifität durch
Beseitigung seiner Ozon-Responsivität erhöht ist.

Die Ozonkonzentrationen in der unteren Troposphäre über den
15 Kontinenten der Nördlichen Hemisphäre haben sich im Laufe der
letzten hundert Jahre in Folge verstärkter industriellen Akti-
vitäten ständig erhöht (Volz and Kley (1988) Nature 332, 240-
242). Inzwischen erreichen die Ozonwerte vorübergehende Spit-
zenkonzentrationen von 100 nl/l bis 200 nl/l in Europa und
20 Nordamerika (Krupa et al. (1995) Environ. Pollut. 87, 119-126).

Die Phytotoxizität des Luftschadstoffes Ozon ist gut untersucht
und dokumentiert; z.B. in Heagle (1989) Annu. Rev. Phytopathol.
27, 397-423; Heath (1994) In: Alscher, Wellburn (ed) "Plant
25 responses to the gaseous environment", pp. 121-145, Chapman &
Hall, London. Eine verringerte Nettophotosynthese und ver-
stärkte frühzeitige Seneszenz sind im allgemeinen das Ergebnis
einer solchen Ozonbelastung, die dadurch geringeres Pflanzen-
wachstum und niedrigere Ernteerträge zur Folge hat.

30

Obwohl Ozon mittels Diffusion durch offene Stomata in die
Pflanzenzelle eindringt, ist die Ozonkonzentration in den
Interzellularräumen des Blattes fast gleich Null, unabhängig
von der Umgebungs-Ozonkonzentration (Laisk et al. (1989) Plant
35 Physiol. 90, 1163-1167). Es wird derzeit angenommen, daß Ozon
rasch mit Bestandteilen der Zellwände und des Plasmalemmas
reagiert und in reaktiv Sauerstoffspezies wie Superoxid-
Anionen, Hydroxylradikale und Wasserstoffperoxid, die in Ozon-
behandeltem Pflanzenmaterial unter Verwendung von Elektronen-

spinresonanzspektroskopie detektiert wurden, umgewandelt wird (Mehlhorn et al. (1990) *Physiologia Plantarum* 79, 377-383). Der sogenannte "oxidative burst", d.h. das rasche Entstehen einer relativ hohen Menge an reaktiven Sauerstoffspezies, kann durch Veränderung der Permeabilität der Plasmamembran, Inaktivierung von redoxsensitiven Proteinen und verstärkte Lipidperoxidation zu einer dramatischen Störung der normalen Zellfunktion führen.

Jüngste Untersuchungen zeigten, daß in Ozon-behandelten Pflanzen eine verstärkte Biosynthese unspezifischer Abwehrenzyme, deren Aufgabe in dem Schutz lebender Zellen vor Schädigung durch oxidativen Streß besteht, stattfindet (Kangasjärvi et al. (1994) *Plant, Cell and Environment* 17, 783-794). Dennoch ist die für die Ozon-induzierte Genaktivierung verantwortliche Signaltransduktionskette, die die entsprechende Information über die Bildung apoplastischer reaktiver Sauerstoffspezies in den Zellkern trägt, bis heute nicht verstanden. Derzeit werden verschiedene Faktoren, wie Anstieg der Calciumkonzentration im Cytosol (Price et al. (1994) *The Plant Cell* 6, 1301-1310), Bildung von Salicylsäure (Klessig and Malamy (1994) *Plant Mol. Biol.* 26, 1439-1458) und the Phytohormone Jasmonsäure (Farmer (1994) *Plant Mol. Biol.* 26, 1423-1437) und Ethylen (Ecker (1995) *Science* 268, 667-674), als mögliche, durch oxidativen Streß verursachte Signalverbindungen, die generell an pflanzlichen Abwehrreaktionen beteiligt sind, diskutiert.

In Untersuchungen mit Ozon-begasten Tabakpflanzen konnte gezeigt werden, daß Ozon eine verstärkte Expression verschiedener Krankheitsresistenzgene, nämlich einiger PR-(Pathogenesis-related)-Proteine, verursacht (Ernst et al. (1992) *Plant Mol. Biol.* 20, 673-682; Ernst et al. (1996) *J. Plant Physiol.* 148, 215-221; Eckey-Kaltenbach et al. (1994) *Plant Physiol.* 104, 67-74). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß ein von Ozon verursachter oxidativer Streß die Expression und Regulation pflanzlicher Abwehrgene in ähnlicher Weise beeinflusst, wie er für Pathogenbefall beschrieben wurde. Gegenwärtig stehen nur sehr begrenzte Informationen über cis-Regulationselement und Transkriptionsfaktoren, die möglicherweise an der Kontrolle der Genexpression unspezifischer Abwehrgene als Antwort auf ver-

- schiedene Umwelteinflüsse beteiligt sind, zur Verfügung (Lee et al. (1994) Eur. J. Biochem. 226, 109-114). Allerdings lassen bisherige Ergebnisse vermuten, daß im Fall der für die PR-Proteine kodierenden Gene getrennte oder zumindest nur teilweise überlappende Signaltransduktionswege existieren (Somssich (1994) In: Nover (ed) "Plant promoters and transcription factors", pp. 163-179, Springer-Verlag, Berlin; Dolferus et al. (1994) Plant Physiol. 105, 1075-1087).
- 10 Für die Aktivität der an der Phytoalexinsynthese beteiligten Stilbensynthase (STS) ist ebenfalls bekannt, daß sie in adulten Pflanzen durch Umweltstressfaktoren, wie z.B. Pathogenbefall (Langcake (1981) Physiol. Plant Pathol. 18, 213-226), UV-Licht (Fritzemeier and Kindl (1981) Planta 151, 48-52) und Ozon
- 15 (Rosemann et al. (1991) Plant Physiol. 97, 1280-1286) induziert wird. Im Gegensatz dazu wurde in Keimlingen ein konstitutives Expressionsmuster beobachtet (Sparvoli et al. (1994) Plant Mol. Biol. 24, 743-755).
- 20 Stilbensynthaseenzyme katalysieren die Synthese von Stilbenen wie Resveratrol bzw. Pinosylvin aus einem Molekül p-Cumaroyl-CoA bzw. Cinnamoyl-CoA und drei Einheiten Malonyl-CoA. Sowohl Resveratrol als auch Pinosylvin besitzen Phytoalexineigenschaften und antifungale Aktivität und haben als Phytoalexine zusammen mit anderen aus dem Phenylpropanstoffwechsel abgeleiteten
- 25 Stilbenen eine wichtige Funktion in der Abwehr von Krankheitserregern (Hart (1981) Annu. Rev. Phytopathol. 19, 437-458).
- STS-Gene kommen in einigen nicht miteinander verwandten Pflanzenspecies, wie z.B. Erdnuß (Schröder et al. (1988) Eur. J. Biochem. 172, 161-169), Weinrebe (Hain et al. (1993) Nature 361, 153-156) und Kiefer (Fliegmann et al. (1992) Plant Mol. Biol. 18, 489-503), vor und sind in größeren Genfamilien, bestehend aus sechs oder mehr Genen, organisiert (Lanz et al.
- 30 (1990) Planta 181, 169-175; Wiese et al. (1994) Plant Mol. Biol. 26, 667-677).

Experimente mit transgenen Tabakzellen deuteten darauf hin, daß die Expression der Stilbensynthase hauptsächlich auf Transkrip-

tionsebene reguliert wird und die Streß-induzierte Signaltransduktionskette in verschiedenen Pflanzenspezies im Laufe der Evolution konserviert worden ist (Hain et al. (1990) Plant Mol. Biol. 15, 325-335).

5

STS-Gene aus Erdnuß (Arachis hypogaea) und Weinrebe (Vitis vinifera) wurden bereits isoliert (Schröder et al. (1988) supra bzw. Hain et al. (1993) supra) und in transgenen Pflanzen zur Expression gebracht (Hain et al. (1990) supra bzw. Hain et al. 10 (1993) supra).

Für Stilbensynthese kodierende DNA-Sequenzen sind beispielsweise aus der europäischen Patentschrift EP 0 309 862, der deutschen Patentanmeldung DE-A-41 07 396, der europäischen 15 Patentanmeldung 0 464 461 sowie der US-Patentschrift 5,500,367 bekannt. In diesen Dokumenten wird die Isolierung von Stilbensynthese-Genen und ihre Verwendung zur Erzeugung von transgenen Pflanzen beschrieben. Die resultierenden transgenen Pflanzen weisen eine erhöhte Resistenz gegenüber verschiedenen 20 Pflanzenschädlingen, wie Pilzen, Bakterien, Insekten, Viren und Nematoden auf. STS-Gene enthaltene Plasmide wurden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSMZ), Mascheroder Weg 1B, D-38124 Braunschweig hinterlegt, so z.B. auch das Vst1-Gen aus Weinrebe in dem Plasmid pVst1 unter der Hinterlegungsnummer 25 DSM 6002 (DE-A-41 07 396, EP-A-0 464 461, US-Patent 5,500,367).

Während inzwischen auch die Verwendung von STS-kodierenden Sequenzen zur Erzeugung männlich steriler Pflanzen und veränderter Blütenfarbe beschrieben wurde (deutsche Patentanmeldung DE- 30 A-44 40 200), ist ein möglicher Zusammenhang zwischen STS-Genexpression und Ozon-Induktion bis heute vollkommen unerforscht.

Es gibt inzwischen verschiedene Hinweise darauf, daß es für eine möglichst effiziente Krankheitsresistenz basierend auf der 35 Expression von STS-Genen in transgene Pflanzen vorteilhaft ist, wenn die Expression des heterologen STS-Gens (bzw. der heterologen STS-Gene) in der Pflanze erst durch das angreifende Pathogen, d.h. erst durch die Interaktion von Pflanze und Krankheitserreger, stimuliert wird (Fischer and Hain (1994)

- 5 -

Current Opinion in Biotechnology 5, 125-130; Fischer (1994)
"Optimierung der heterologen Expression von Stilbensynthase-
genen für den Pflanzenschutz", Universität Hohenheim). Hierfür
spricht besonders die Beobachtung, daß die Pathogen-induzierte
5 STS-Genexpression lokal auf den Infektionsort begrenzt ist und
transient stattfindet, d.h. die STS-Expression steigt relativ
rasch auf ein Maximum an und klingt innerhalb von weniger als
48 h wieder ab (Hain et al. (1993) supra). Ebenso zeigten
Untersuchungen mit transgenen Tabakpflanzen, in denen STS-Gene
10 unter dem konstitutiven 35S RNA Promoter von Cauliflower Mosaic
Virus zur Expression gebracht wurden, daß die in diesen Pflan-
zen erzielte Krankheitsresistenz geringer ist als in Pflanzen,
die die gleichen Gene unter Kontrolle des Pathogen-induzier-
baren homologen STS-Promoters nach Pilzbefall exprimierten
15 (Fischer and Hain (1994) supra; Fischer (1994) supra). In jedem
Fall ist es wünschenswert, daß die STS-Expression in transgenen
(Kultur)pflanzen, die aufgrund der eingebrachten STS-Gene eine
erhöhte Krankheitsresistenz aufweisen, alleine (und erst) durch
den Befall von Pathogenen und nicht zusätzlich (bzw. bereits
20 vorher) durch unerwünschte Umweltstressfaktoren, wie Ozon, -akti-
viert und kontrolliert werden.

Es ist somit eine wichtige Aufgabe der biotechnologischen
Pflanzenschutzforschung, eine spezifischere Expression pflanz-
25 licher Abwehrgene in Pflanzen zu realisieren, um auf diesem
Wege molekularbiologische Strategien zur Erzeugung widerstands-
kräftigerer Pflanzen kontrollierbar und effizient umsetzen zu
können. Ein wichtiger Aspekt hierbei ist das Ausschalten uner-
wünschter unspezifischer Umweltstimuli, wie z.B. die Induktion
30 bestimmter Abwehrgene durch Ozon, UV-Licht, Schwermetalle, ex-
treme Temperaturen und andere abiotische Stimuli.

Es ist somit eine wichtige Aufgabe der vorliegenden Erfindung,
neue DNA-Sequenzen bereitzustellen, die unmittelbar an der
35 Ozon-induzierten Expression von Resistenzgenen beteiligt sind.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht darin, Möglichkeiten
zur Beseitigung der Ozon-Induktion, d.h. zur Ausschaltung uner-

wünschter Stimulierung der Genexpression durch Ozon, aufzuzeigen.

Desweiteren ist es eine wichtige Aufgabe der Erfindung, eine
5 DNA-Sequenz zu liefern, mit deren Hilfe Stilbensynthasegene
erst nach Kontakt der Pflanze mit einem Pathogen und nicht
durch Ozon-Stimulierung in transgenen Pflanzen zur Expression
gebracht werden können.

- 10 Wie eingangs bereits erwähnt wurde, ist eine stete Zunahme der
Ozonbelastung zu beobachten, die auch drastische Einflüsse auf
die Vegetation ausübt. Die Beobachtung und Bestimmung der Ozon-
konzentrationen in der Luft stellen bereits heute einen Schwer-
15 forschung dar. In diesem Zusammenhang stellen sogenannte Bio-
monitoren, mit deren Hilfe Ozonbelastungen und deren Folgen,
besonders der phytotoxischen Effekte, qualitativ und quanti-
tativ einfach zu bestimmen sind, ein wichtiges Instrument dar.
- 20 Somit liegt eine weitere Aufgabe der Erfindung in der Bereit-
stellung von DNA-Sequenzen, die zur Erzeugung gezielt Ozon-
induzierbarer Promotoren verwendet werden können. Mit Hilfe
solcher Promotoren können sog. Reportergene, deren Expression
durch einfache enzymatische Tests nachweisbar ist und die in
25 der biotechnologischen Forschung wohlbekannt sind, auf sehr
einfache und zuverlässige Weise als Biomonitorien Einsatz
finden.

- Weiter ist es eine Aufgabe der Erfindung, ein System bereitzu-
30 stellen, mit dessen Hilfe bestimmte Gene, deren Genprodukte in
der Lage sind, in Zellen reaktive Sauerstoffspezies zu entgif-
ten, im Bedarfsfall, also bei hoher Ozonbelastung, "angeschal-
tet" werden können. Genauer gesagt, soll durch die Bereitstel-
lung von DNA-Sequenzen, die für Ozon-responsive Genregulation
35 verantwortlich sind, eine Ozon-induzierbare Expression solcher
Gene, wie z.B. Katalase- und/oder Superoxiddismutasegene, mög-
lich werden. Somit ist es eine Aufgabe der Erfindung, DNA-
Sequenzen bereitzustellen, die zur Erzeugung eines durch Ozon
induzierbaren zellulären "Ozon-Schutzsystems" eingesetzt werden

können. Weitere Aufgaben der Erfindung ergeben sich aus der folgenden Beschreibung.

Diese Aufgaben werden durch die Gegenstände der unabhängigen Ansprüche, insbesondere basierend auf der Bereitstellung der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen, die unmittelbar an Ozon-induzierter Genexpression in Pflanzen beteiligt sind, gelöst.

Wir haben überraschend gefunden, daß eine bestimmte pflanzliche Nukleinsäuresequenz unmittelbar an der Ozon-responsiven STS-Expression beteiligt ist. Während Experimente mit transgenen Tabakkeimlingen und -pflanzen, die das gebräuchliche Reportergen uidA aus E. coli, das für eine β -Glucuronidase kodiert, unter Kontrolle verschieden langer 5'-Deletionen des Vst1-Promotors aus Weinrebe exprimieren, darauf hinweisen, daß zumindest einige für die Pilzinduktion verantwortliche cis-Elemente in dem Bereich des Promotors liegen, der die Basenpaare -140 bis -280 (vom Transkriptionsstart aus gerechnet) umfaßt (Fischer (1994) supra), ist der Bereich der Vst1-Sequenz, der die Basenpaare -280 bis -430 umfaßt, für eine starke Aktivierung der Genexpression durch Ozon essentiell. Aufgrund unserer Experimente konnte gezeigt werden, daß ein Vst1-Promotor, der nur noch die Basenpaare bis einschließlich -280 besitzt (und dem somit die weiter upstream liegenden Vst1-Promotorsequenzen fehlen) nicht mehr Ozon-induzibel ist. Wie oben erwähnt, ist dieser verkürzte Promotor aber trotzdem noch in der Lage, Pathogen-induzierte Genexpression der durch ihn kontrollierten kodierenden Sequenz zu vermitteln (siehe Fischer (1994) supra).

30

Unsere Analysen lassen desweiteren einen Zusammenhang zwischen der Behandlung von Pflanzen mit Ozon und einer verstärkten Biosynthese bzw. Freisetzung von Ethylen in den Pflanzenzellen vermuten. Demnach ist eine Mitwirkung Ethylen-responsiver Elemente bei der Ozon-induzierten Genexpression nicht auszuschließen. Entsprechend kann unter Berücksichtigung bekannter cis-Elemente, die derzeit im Zusammenhang mit Ethylen-Responsivität diskutiert werden (Sessa et al. (1995) Plant Mol. Biol. 28, 145-153; Shinshi et al. (1995) Plant Mol. Biol. 27, 923-

- 8 -

932), eine Beteiligung des Sequenzbereichs des Vst1-Promotors, der die Basenpaare -283 bis -273 umfaßt, an einer Ozon-induzierten STS-Genexpression nicht ausgeschlossen werden.

5 Somit umfaßt der hier erstmals beschriebene Ozon-responsive DNA-Sequenzbereich die Basenpaare -270 bis -430 des Vst1-Promotors aus Weinrebe.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung die im Anspruch 1
10 definierte DNA-Sequenz (SEQ ID NO:1):

ACTTTTCGAG CCCCTTGAAC TGGAAATTAA TACATTTTCC ACTTGACTTT
TGAAAAGGAG GCAATCCCAC GGGAGGGAAG CTGCTACCAA CCTTCGTAAT
GTAAATGAAA TCAAAGTCAC TCAATGTCCG AATTTCAAAC CTCANCAACC
CAATAGCCAA T,

15 die für Ozon-induzierte Genexpression in Pflanzen essentiell ist. In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der erfindungsgemäßen DNA-Sequenz um eine DNA-Sequenz, die aus Weinrebe, und besonders bevorzugt aus dem Stilbensynthase-Gen Vst1 aus Weinrebe (Basenpaare -270 bis -430), stammt.

20 Die Erfindung betrifft weiter eine Promotorregion des Vst1-Gens, der mindestens die DNA-Sequenz, die die Basenpaare -270 bis -430 des Vst1-Gens umfaßt, fehlt. In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich um eine Promotorregion des
25 Vst1-Gens, die nur den Sequenzbereich vom Translationsstart bis Basenpaar -270 des Vst1-Gens umfaßt. Besonders bevorzugt ist die Promotorregion, der der Sequenzbereich von -270 bis -430 des Vst1-Gens fehlt, in der Lage, eine pathogen-induzierbare Genexpression in Pflanzen zu vermitteln.

30 Weiter betrifft die Erfindung chimäre Nukleinsäuremoleküle, in die die DNA-Sequenz der Basenpaare -270 bis -430 des Vst1-Gens oder mindestens ein Fragment dieses Sequenzbereichs eingeführt wurde. Besonders bevorzugt ermöglichen die chimären Nukleinsäuremoleküle der Erfindung aufgrund der Anwesenheit der DNA-
35 Sequenz der Basenpaare -270 bis -430 des Vst1-Gens oder mindestens eines Teilbereiches davon eine ozon-induzierbare Expression der in ihnen enthaltenen kodierenden Regionen in Pflanzen.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle können beliebige Nukleinsäuremoleküle sein, insbesondere DNA- oder RNA-Moleküle, beispielsweise cDNA, genomische DNA, mRNA etc. Sie können natürlich vorkommende oder durch gentechnische oder chemische Syntheseverfahren hergestellte Moleküle sein.

Durch die Bereitstellung der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen, Promotorregionen, Nukleinsäuremoleküle oder Vektoren besteht nun die Möglichkeit, pflanzliche Zellen mittels gentechnologischer Methoden dahingehend zu verändern, daß sie eine ozon-induzierbare Merkmalsausprägung aufweisen. Weiter besteht nun die Möglichkeit, pflanzliche Zellen mittels gentechnologischer Methoden dahingehend zu verändern, daß sie ein oder mehrere Gene, die natürlicherweise aufgrund der Anwesenheit der DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder einer davon ableitbaren oder einer mit ihr homologen DNA-Sequenz Ozon-induzierbar ist, nicht mehr durch Ozon induzierbar, bevorzugt im wesentlichen durch Pathogene induzierbar, ausprägen.

Ein besonderer Vorteil der Erfindung besteht darin, daß die Ozon-Induktion von natürlicherweise Ozon-induzierbaren Genen in Pflanzen und Pflanzenzellen durch Deletion der DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens eines Fragments davon in den Genen, die diese DNA-Sequenz oder eine davon ableitbare oder eine mit ihr homologe DNA-Sequenz natürlicherweise enthalten, ausgeschaltet werden kann.

Ein weiterer Vorteil der Erfindung besteht darin, daß natürlicherweise nicht oder nicht wesentlich durch Ozon induzierbare Gene unter Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen in Pflanzen und Pflanzenzellen Ozon-induzierbar ausgeprägt werden können. In einer bevorzugten Ausführungsform kontrolliert die Nukleinsäuresequenz, die für die Ozon-induzierbare Expression verantwortlich ist, oder mindestens ein Fragment davon, die Expression von Genen, deren Genprodukte in der Lage sind, reaktive Sauerstoffspezies, die u. a. als Folge von Ozon in Pflanzenzellen entstehen können, zu entgiften. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform kontrolliert diese

- 10 -

Nukleinsäur sequenz die Expression von Katalase- und/oder Superoxiddismutase-Genen.

- In einer alternativ n Ausführungsform kontrolliert die für die
- 5 Ozon-induzierbare Genexpression verantwortliche DNA-Sequenz die Expression von Reportergene, die zur quantiativen und/oder qualitativen Bestimmung von Ozonkonzentrationen und zur Bewertung von Ozonauswirkungen, gemessen wird. Solche Reportergene können z.B. das uidA-Gen aus E. coli, das für das Enzym β -
- 10 Glucuronidase (GUS) kodiert, Luciferase-Gene oder andere in der pflanzlichen Biotechnologie gebräuchliche Gene sein. Geeignete Reportergene sind jedem in dem Gebiet der Biotechnologie, Biochemie oder Molekularbiologie ausgebildeten Fachmann bekannt.
- 15
- Weiter betrifft die vorliegende Erfindung Vektoren, welche die oben genannten DNA-Sequenzen oder Promotorregionen oder Teile davon enthalten. Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch Vektoren, insbesondere Plasmide, Cosmide, Viren, Bakteriophagen
- 20 und andere in der Gentechnik gängige Vektoren, die die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle enthalten und gegebenenfalls für den Transfer der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle auf Pflanzen bzw. Pflanzenzellen eingesetzt werden können.
- 25
- Ebenso betrifft die Erfindung transformierte Mikroorganismen, wie Bakterien, Viren, Pilze, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen enthalten.
- 30 Es ist ebenso eine Aufgabe der Erfindung, neue Pflanzen und Pflanzenzellen bereitzustellen, die sich durch das Fehlen der Ozon-induzierbaren Expression von Genen, die natürlicherweise in Pflanzen durch Ozon induziert werden, auszeichnen.
- 35 Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der für die Ozon-Induktion verantwortlichen DNA-Sequenz und die Bereitstellung von Promotoren, denen diese Sequenz fehlt und di aus diesem Grund eine nicht m hr durch Ozon-induzierbare Genexpression der

- 11 -

durch si kontrollierten Gene in Pflanzen und pflanzlich n Zellen ermöglichen, gelöst.

Die Aufgabe, Ozon-responsive Genexpression von Genen, die
5 natürlicherweise nicht durch Ozon induzierbar sind, zu ermög-
lichen, wird ebenfalls durch Bereitstellung der erfindungsge-
mäßigen DNA-Sequenz gelöst. Dadurch werden Pflanzen und Pflanzen-
zellen bereitgestellt, die gezielt bei Ozon-Anwesenheit
bestimmte Merkmale ausprägen.

10

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich um
transformierte Pflanzen und Pflanzenzellen, in denen Gene Ozon-
induzierbar exprimiert werden, deren Genprodukte in der Lage,
sind reaktive Sauerstoffspezies in Pflanzenzellen zu entgiften.
15 Besonders bevorzugt handelt es sich hierbei um Katalase-
und/oder Superoxiddismutase-Gene. Alternativ können Pflanzen
und Pflanzenzellen (einschließlich Protoplasten) erzeugt
werden, die sog. Reportergene nach Induktion durch Ozon
ausprägen und die ggf. als Biomonitoren eingesetzt werden
20 können.

Gegenstand der Erfindung sind somit transgene Pflanzen, die die
oben beschriebenen rekombinanten Nukleinsäuremoleküle, inte-
griert in das pflanzliche Genom vorliegend, enthalten. Bei
25 diesen Pflanzen kann es sich im Prinzip um jede beliebige
Pflanze handeln. Vorzugsweise ist es eine monokotyle oder
dikotyle Nutzpflanze. Beispiele für monokotyle Pflanzen sind
die Pflanzen, die zu den Gattungen Avena (Hafer), Triticum
(Weizen), Secale (Roggen), Hordeum (Gerste), Oryza (Reis),
30 Panicum, Pennisetum, Setaria, Sorghum (Hirse), Zea (Mais)
gehören. Bei den dicotylen Nutzpflanzen sind u.a. zu nennen
Baumwolle, Leguminosen, wie Hülsenfrüchte und insbesondere
Alfalfa, Sojabohne, Raps, Tomate, Zuckerrübe, Kartoffel,
Zierpflanzen, Bäume. Weitere Nutzpflanzen können Obst (insbe-
35 sondere Äpfel, Birnen, Kirschen, Weintrauben, Citrus, Ananas
und Bananen), Ölpalmen, Tee-, Kakao- und Kaffeesträucher,
Tabak, Sisal sowie bei Heilpflanzen Rauwolfia und Digitalis
sein. Besonders bevorzugt sind di Getreide Weizen, Roggen,

- 12 -

Hafer, Gerste, Reis, Mais und Hirse, Zuckerrübe, Raps, Soja, Tomate, Kartoffel und Tabak.

Gegenstand der Erfindung ist ferner Vermehrungsmaterial von
5 erfindungsgemäßen Pflanzen, beispielsweise Samen, Früchte, Stecklinge, Knollen, Wurzelstöcke etc., sowie Teile dieser Pflanzen wie Pflanzenzellen, Protoplasten und Kalli.

Die Pflanzenzellen umfassen differenzierte und undifferenzierte
10 Pflanzenzellen (einschließlich Protoplasten), sowie Pflanzenzellen (einschließlich Protoplasten), in denen die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle integriert in das pflanzliche Genom oder als autonome Moleküle (einschließlich transiente Transformation) vorliegen.

15 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Wirtszellen, insbesondere prokaryontische und eukaryontische Zellen, die mit einem oben beschriebenen rekombinanten Nukleinsäuremolekül oder einem Vektor transformiert bzw. infiziert wurden,
20 und Zellen, die von derartigen Wirtszellen abstammen und die beschriebenen Nukleinsäuremoleküle oder Vektoren enthalten. Die Wirtszellen können Bakterien oder Pilzzellen sowie pflanzliche oder tierische Zellen sein.

25 Der vorliegenden Erfindung liegt außerdem die Aufgabe zugrunde, Verfahren zur Herstellung von Pflanzen und Pflanzenzellen aufzuzeigen, die sich durch Fehlen einer Ozon-induzierbaren Expression eines Gens, dessen Expression in Pflanzen und Pflanzenzellen natürlicherweise durch Ozon stimuliert wird,
30 auszeichnen.

Diese Aufgabe wird durch Verfahren gelöst, mit deren Hilfe die Erzeugung neuer Pflanzen und Pflanzenzellen, die diese natürlicherweise vorkommende Ozon-induzierte Genexpression
35 nicht aufweisen, möglich ist.

Der vorliegenden Erfindung liegt, wie oben bereits erwähnt, ebenfalls die Aufgabe zugrunde, Verfahren zur Herstellung von Pflanzen und Pflanzenzellen, die solche Gene, deren Expression

natürlicherweise nicht oder nicht wesentlich durch Ozon aktiviert wird, nach Ozon-Stimulierung exprimieren, bereitzustellen. Diese Aufgabe wird durch Verfahren gelöst, mit deren Hilfe Pflanzen und Pflanzenzellen erzeugt werden können, die nach Einführung der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen oder mindestens eines Teilbereiches davon in natürlicherweise nicht oder nur schwach ozoninduzierbare Gene diese Gene nach Ozon-Stimulierung exprimieren.

10 Zur Erzeugung solcher neuer Pflanzen bzw. Pflanzenzellen bieten sich verschiedene Methoden an. Zum einen können Pflanzen bzw. Pflanzenzellen mit Hilfe herkömmlicher gentechnologischer Transformationsmethoden derart verändert werden, daß die neuen Nukleinsäuremoleküle in das pflanzliche Genom integriert werden, d.h. daß stabile Transformanten erzeugt werden.

Erfindungsgemäß werden Pflanzen bzw. Pflanzenzellen, die aufgrund des Fehlens der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz oder mindestens eines Fragmentes davon eine Ozoninduktion des/der diese Sequenz natürlicherweise enthaltenden Gens/e nicht mehr zeigen, durch ein Verfahren hergestellt, das folgende Schritte umfaßt:

- a) Deletion der im Anspruch 1 definierten DNA-Sequenz bzw. einer Sequenz, die sich von dieser Sequenz ableiten läßt oder die mit dieser Sequenz homolog ist, oder mindestens eines Fragments dieser Sequenz aus einem Gen, das nach der Deletion der erfindungsgemäßen DNA-Sequenz Regulationselemente, die für die, ggf. regulierte, Transkription und Translation in Pflanzenzellen unentbehrlich sind, mindestens eine kodierende Sequenz, sowie ggf. ein Terminationssignal für die Termination der Transkription und die Addition eines poly-A-Schwanzes an das entsprechende Transkript umfaßt;
- b) Transformation pflanzlicher Zellen mit dem in Schritt a) hergestellten Gen bzw. Nukleinsäuremolekül, und
- c) ggf. die Regeneration transgener Pflanzen und ggf. die Vermehrung der Pflanzen.

- 14 -

Alternativ kann in Schritt a) anstelle des Deletierens der für die Ozon-Induktion verantwortlichen Sequenz, diese Sequenz oder zumindest ein Teil davon, z.B. durch Mutagenese, inaktiviert bzw. blockiert werden und in inaktivierter Form in dem Gen 5 verbleiben. Unabhängig davon, auf welche Weise der Ozon-responsive Genbereich ausgeschaltet wird, können alle Manipulationsmaßnahmen mit Hilfe allgemein üblicher Methoden und Hilfsmittel der rekombinanten Gentechnik durchgeführt werden (siehe z.B. Sambrook et. al. (1989) Molecular Cloning: A 10 Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält das Nukleinsäuremolekül, das in Schritt b) auf Pflanzen bzw. 15 Pflanzenzellen übertragen wird, Regulationselemente, die eine z.B. Pathogen-induzierte Genexpression der kodierenden Sequenz ermöglichen.

Erfindungsgemäß werden Pflanzen bzw. Pflanzenzellen, die 20 aufgrund der Anwesenheit der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz, die für eine Ozon-induzierte Expression der sie enthaltenden Gene essentiell bzw. mitverantwortlich ist, oder mindestens eines Fragmentes dieser Sequenz, durch ein Verfahren hergestellt, das folgende Schritte umfaßt:

- 25 a) Einfügung mindestens einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz, die in Pflanzen eine Ozon-induzierte Genexpression bewirken kann, oder einer Sequenz, die sich von dieser Sequenz ableiten läßt oder die mit dieser Sequenz homolog ist, oder mindestens eines Fragments dieser Sequenz in 30 ein Gen, das natürlicherweise nicht oder nicht wesentlich Ozon-induzierbar exprimiert wird
- b) Transformation pflanzlicher Zellen mit dem in Schritt a) hergestellten Gen bzw. Nukleinsäuremolekül, das über 35 sämtliche natürlicherweise für die Expression in Pflanzenzellen erforderlichen Elemente verfügt, und
- c) ggf. die Regeneration transgener Pflanzen und ggf. die Vermehrung der Pflanzen.

- 15 -

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Gen um ein Katalase-, Superoxiddismutase- oder ein gebräuchliches Reportergen.

- 5 Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht darin, vorteilhafte Verwendungen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen aufzuzeigen.

- Die Erfindung umfaßt daher Verwendungen der neuen DNA-Moleküle
10 zur Erzeugung der oben beschriebenen erfindungsgemäßen Pflanzen und Pflanzenzellen, die sich entweder durch das Fehlen einer normalerweise durch Ozon beeinflussten Ausprägung eines bestimmten phänotypischen Merkmals auszeichnen, oder die gerade aufgrund der Anwesenheit der erfindungsgemäßen DNA-Sequenz
15 durch Ozon-induzierte Merkmalsausprägung von nicht-transgenen Pflanzen und Pflanzenzellen unterscheiden, gelöst.

- Desweiteren umfaßt die Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle zur Erzeugung von Pflanzen, die
20 sich durch eine erhöhte pathogeninduzierte, aber nicht-ozoninduzierte Krankheitsresistenz auszeichnen.

- Desweiteren betrifft die Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen oder Fragmenten davon zur
25 Auffindung und Identifizierung von Ozon-responsiven Nukleinsäureelementen.

- Solche Ozon-responsiven Nukleinsäureelemente kann der Fachmann mit Hilfe gängiger molekularbiologischer Methoden, z.B. Hybridisierungsexperimenten oder DNA-Protein-Bindungsstudien identifizierten. Dabei wird z.B. in einem ersten Schritt aus einem Gewebe, welches mit Ozon behandelt wurde, die poly(A)⁺ RNA isoliert und eine cDNA-Bank angelegt. In einem zweiten Schritt werden mit Hilfe von cDNA-Klonen, die auf poly(A)⁺ RNA-Molekülen aus einem nicht-behandelten Gewebe basieren, aus der ersten Bank mittels Hybridisierung diejenigen Klone identifiziert, deren korrespondierende poly(A)⁺ RNA-Moleküle lediglich bei Ozonbehandlung induziert werden. Anschließend werden mit Hilfe dieser so identifizierten cDNAs Promotoren isoliert, die über
- 30
35

- 16 -

Ozon-responsive Elemente verfügen. Bei der Untersuchung und Charakterisierung dieser isolierten Promotoren können die Nukleinsäuresequenzen und -moleküle nützliche Instrumente darstellen.

5

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls Nukleinsäuremoleküle oder Fragmente davon, die mit einem der oben beschriebenen Nukleinsäuremoleküle oder einer der oben beschriebenen DNA-Sequenzen der Erfindung hybridisieren. Der Begriff "Hybridisierung" bedeutet im Rahmen dieser Erfindung eine Hybridisierung unter konventionellen Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen, wie sie beispielsweise in Sambrook et al (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, beschrieben sind.

20

Nukleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Molekülen hybridisieren, können z.B. aus genomischen oder aus cDNA-Bibliotheken isoliert werden.

Die Identifizierung und Isolierung derartiger Nukleinsäuremoleküle kann dabei unter Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle oder Teile dieser Moleküle bzw. der reversen Komplemente dieser Moleküle erfolgen, z.B. mittels Hybridisierung nach Standardverfahren (siehe z.B. Sambrook et al, supra).

Somit betrifft die Erfindung ebenfalls die Verwendung einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz oder von Teilen davon zur Identifizierung und Isolierung homologer Sequenzen aus Pflanzen oder anderen Organismen.

Als Hybridisierungssonde können z.B. Nukleinsäuremoleküle verwendet werden, die exakt oder im wesentlichen die erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen oder Teile dieser Sequenzen aufweisen. Bei den als Hybridisierungssonde verwendeten Fragmenten kann es sich auch um synthetische Fragmente handeln, die mit Hilfe der gängigen Synthesetechniken hergestellt wurden und deren Sequenz im wesentlichen mit der eines erfindungsgemäßen

- 17 -

Nukleinsäuremoleküls übereinstimmt. Hat man Gene identifiziert und isoliert, die mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen hybridisieren, ist eine Bestimmung der Sequenz und eine Analyse der Eigenschaften erforderlich. Hierzu stehen dem
5 Fachmann eine Reihe von molekularbiologischen, biochemischen und biotechnologischen Standardverfahren zur Verfügung.

- Die mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen hybridisierenden Moleküle umfassen auch Fragmente, Derivate und
10 allelische Varianten der oben beschriebenen DNA-Moleküle, die eine Ozon-responsive Sequenz, in aktiver oder inaktivierter Form, enthalten oder die sich gerade dadurch auszeichnen, daß sie diese Sequenz nicht mehr aufweisen. Der Ausdruck "Derivat" bedeutet in diesem Zusammenhang, daß die Sequenzen dieser
15 Moleküle sich von den Sequenzen der oben beschriebenen Nukleinsäuremoleküle an einer oder mehreren Positionen unterscheiden und einen hohen Grad an Homologie zu diesen Sequenzen aufweisen. Homologie bedeutet dabei eine Sequenzidentität von mindestens 40%, insbesondere eine Identität von mindestens 60%,
20 vorzugsweise über 80% und besonders bevorzugt über 90%. Die Abweichungen zu den oben beschriebenen Nukleinsäuremolekülen können dabei durch Deletion, Addition, Substitution, Insertion oder Rekombination entstanden sein.
- 25 Bei den Nukleinsäuremolekülen, die homolog zu den oben beschriebenen Molekülen sind und Derivate dieser Moleküle darstellen, handelt es sich in der Regel um Variationen dieser Moleküle, die Modifikationen darstellen, die dieselbe biologische Funktion ausüben. Es kann sich dabei sowohl um natür-
30 licherweise auftretende Variationen handeln, beispielsweise um Sequenzen aus anderen Organismen, oder um Mutationen, wobei diese Modifikationen auf natürliche Weise aufgetreten sein können oder durch gezielte Mutagenese eingeführt wurden. Ferner kann es sich bei den Variationen um synthetisch hergestellte
35 Sequenzen handeln. Bei den allelischen Varianten kann es sich sowohl um natürlich auftretende als auch um synthetisch hergestellte oder durch rekombinante DNA-Techniken erzeugte Varianten handeln.

Zur Vorbereitung der Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen bzw. deren Zellen stehen eine große Anzahl von Klonierungsvektoren zur Verfügung, die ein Replikationssignal für E. coli und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen enthalten. Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC184 usw. Die gewünschte Sequenz kann an einer passenden Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingeführt werden. Das erhaltene Plasmid wird für die Transformation von E. coli-Zellen verwendet. Transformierte E. coli-Zellen werden in einem geeigneten Medium gezüchtet und anschließend geerntet und lysiert. Das Plasmid wird wiedergewonnen. Als Analyseverfahren zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA werden im allgemeinen Restriktionsanalysen, Gelelektrophoresen und weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden eingesetzt. Nach jeder Manipulation können die Plasmid-DNA gespalten und gewonnene DNA-Fragmente mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden. Jede Plasmid-DNA-Sequenz kann in den gleichen oder anderen Plasmiden kloniert werden.

20

Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl bekannter Techniken zur Verfügung, wobei der Fachmann die jeweils geeignete Methode ohne Schwierigkeiten ermitteln kann. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von Agrobacterium tumefaciens oder Agrobacterium rhizogenes als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, den direkten Gentransfer isolierter DNA in Protoplasten, die Elektroporation von DNA, die Einbringung von DNA mittels der biolistischen Methode sowie weitere Möglichkeiten. Dabei können sowohl stabile als auch transiente Transformanten erzeugt werden.

Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden per se keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Ähnliches gilt für den direkten Gentransfer. Es können einfache Plasmide wie z.B. pUC-Derivate verwendet werden. Sollen aber aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, ist die Anwesenheit eines selek-

- 19 -

- tierbaren Markergens notwendig. Dem Fachmann sind die gängigen Selektionsmarker bekannt und es stellt für ihn kein Problem dar, einen geeigneten Marker auszuwählen. Gebräuchliche Selektionsmarker sind solche, die den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biozid oder einem Antibiotikum wie Kanamycin, G418, Bleomycin, Hygromycin, Methotrexat, Glyphosat, Streptomycin, Sulfonyl-Harnstoff, Gentamycin oder Phosphinotricin u.a. vermitteln.
- 10 Je nach Einführungsmethode gewünschter Gene in die Pflanzenzelle können weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Werden z.B. für die Transformation der Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so muß mindestens die rechte Begrenzung, häufig jedoch die rechte und linke Begrenzung der im Ti- und
- 15 Ri-Plasmid enthaltenen T-DNA als Flankenbereich mit den einzuführenden Genen verbunden werden.

- Werden für die Transformation Agrobakterien verwendet, muß die einzuführende DNA in spezielle Plasmide kloniert werden, und
- 20 zwar entweder in einen intermediären oder in einen binären Vektor. Die intermediären Vektoren können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer
- 25 der T-DNA notwendige vir-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf Agrobacterium tumefaciens übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren können sowohl in E. coli als auch in Agrobakterien replizieren.
- 30 Sie enthalten ein Selektionsmarker-Gen und einen Linker oder Polylinker, welche von der rechten und linken T-DNA-Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden (Holsters et al (1978) Molecular and General Genetics 163, 181-187). Das als Wirtszelle dienende
- 35 Agrobakterium soll ein Plasmid, das eine vir-Region trägt, enthalten. Die vir-Region ist für den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle notwendig. Zusätzliche T-DNA kann vorhanden sein. Das derartig transformierte Agrobakterium wird zur Transformation von Pflanzenzellen verwendet.

- 20 -

Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120 515; Ho kema in: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam (1985) Chapter V; Fraley et al 5 (1993) Crit. Rev. Plant. Sci., 4, 1-46 und An et al (1985) EMBO J. 4, 277-287 beschrieben worden.

Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate zweckmäßigerweise mit Agrobacterium tumefaciens oder 10 Agrobacterium rhizogenes kultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z.B. Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensions-kultivierte Pflanzenzellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen ent- 15 halten kann, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden. Die Regeneration der Pflanzen erfolgt nach üblichen Regenerationsmethoden unter Verwendung bekannter Nährmedien. Die so erhaltenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen können dann auf Anwesenheit der eingeführten DNA untersucht werden. Andere Möglichkeiten 20 der Einführung fremder DNA unter Verwendung des biolistischen Verfahrens oder durch Protoplasten-Transformation sind bekannt (vgl. z.B. Willmitzer L. (1993) Transgenic Plants, in: Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise (H.J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, eds.) Vol. 2, 627-659, 25 V.C.H. Weinheim - New York - Basel - Cambridge).

Während die Transformation dikotyler Pflanzen bzw. deren Zellen über Ti-Plasmid-Vektorsysteme mit Hilfe von Agrobacterium tumefaciens wohl etabliert ist, weisen neuere Arbeiten darauf 30 hin, daß auch monokotyle Pflanzen bzw. deren Zellen der Transformation mittels Agrobacterium-basierender Vektoren sehr wohl zugänglich sind (Chan et al (1993) Plant Mol. Biol. 22, 491-506; Hiei et al (1994) Plant J. 6, 271-282; Deng et al (1990) Science in China 33, 28-34; Wilmink et al (1992) Plant 35 Cell Reports 11, 76-80; May et al (1995) Bio/Technology 13, 486-492; Conner und Domiss (1992) Int. J. Plant Sci. 153, 550-555; Ritchie et al (1993) Transgenic Res. 2, 252-265).

Alternative Systeme zur Transformation von monokotylen Pflanzen bzw. deren Zellen sind die Transformationen mittels des biolistischen Ansatzes (Wan und Lemaux (1994) Plant Physiol. 104, 37-48; Vasil et al (1993) Bio/Technology 11, 1553-1558; 5 Ritala et al (1994) Plant Mol. Biol. 24, 317-325; Spencer et al (1990) Theor. Appl. Genet. 79, 625-631), die Protoplasten-Transformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, die Einbringung von DNA mittels Glasfasern.

10

Die transformierten Zellen wachsen innerhalb der Pflanze in der üblichen Weise (siehe auch McCormick et al (1986) Plant Cell Reports 5, 81-84). Die resultierenden Pflanzen können normal angezogen werden und mit Pflanzen, die die gleiche transformierte Erbanlage oder andere Erbanlagen besitzen, gekreuzt 15 werden. Die daraus entstehenden hybriden Individuen haben die entsprechenden phänotypischen Eigenschaften.

Es sollten zwei oder mehrere Generationen angezogen werden, um 20 sicherzustellen, daß das phänotypische Merkmal stabil beibehalten und vererbt wird. Auch sollten Samen geerntet werden, um sicherzustellen, daß der entsprechende Phänotyp oder andere Eigenarten erhalten geblieben sind.

25 Ebenso können nach üblichen Methoden transgene Linien bestimmt werden, die für die neuen Nukleinsäuremoleküle homozygot sind und ihr phänotypisches Verhalten hinsichtlich einer vorhandenen bzw. nicht vorhandenen Ozon-Responsivität untersucht und mit dem von hemizygoten Linien verglichen werden.

30

Selbstverständlich können Pflanzenzellen, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle enthalten, auch als Pflanzenzellen (einschließlich Protoplasten, Kalli, Suspensionskulturen u.ä.) weiterkultiviert werden.

35

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle oder Teile dieser Moleküle bzw. der reversen Komplemente dieser Moleküle zur Identifizierung und Isolierung homologer Moleküle.

- 22 -

die Ozon-responsive Elemente umfassen aus Pflanzen oder anderen Organismen. Für die Definition des Begriffes "Homologie" siehe oben.

5 Die nachfolgenden Beispiele dienen zur Erläuterung der Erfindung.

10

BEISPIELE

Beispiel 1:

Konstruktion der 5'-Deletionen des Vst1-Promotors als GUS-
15 Fusionskonstrukte in dem binären Vektor pPCV002

Der im folgenden als Promotor bezeichnete 5'-nicht-kodierende Sequenzbereich des Vst1-Gens aus Weinrebe besteht aus 1570 Basenpaaren. Dieser Promotor, dessen Sequenz u.a. aus der
20 deutschen DE 41 07 396 und Fischer (1994) supra bekannt ist, wurde mit Hilfe einer herkömmlichen Polymerase-Ketten-Reaktion unter Verwendung der folgenden Oligonukleotide als Primer und dem das vollständige Vst1-Gen enthaltende Plasmid pVst1 (DE-A-41 07 396; Fischer (1994) supra) als Template amplifiziert:

25

- 5'- CCCCAAGCTT CCCCGGATCA CATTCTATG AGT -3' (Primer 1, SEQ ID NO: 2)
- 5'- CGCGGATCCT CAATTGAAGC CATTGATCCT AGCT -3' (Primer 2, SEQ ID NO: 3).

30

Die PCR-Reaktion wurde nach dem Protokoll von Perkin Elmer (Norwalk, USA) unter Verwendung der Nativen Taq DNA Polymerase von Perkin Elmer durchgeführt. Das unter üblichen PCR-Bedingungen amplifizierte DNA-Fragment wurde anschließend mit den
35 Restriktionsenzymen HindIII (diese Restriktionsschnittstelle ist am 5'-Ende von Primer 1 enthalten) und BamHI (diese Restriktionsschnittstelle ist am 5'-Ende von Primer 2 enthalten) nachgeschnitten und zusammen mit dem BamHI/EcoRI-Fragment aus dem Vektor pBI101.2 (Jefferson (1987) Plant M l. Biol.

- Reporter 5, 387-405), welches das β -Glucuronidase-Reportergen (GUS, uidA) aus E. coli zusammen mit dem Terminationssignal des nos-Gens aus A. tumefaciens enthält, über die HindIII- und EcoRI-Restriktionsschnittstellen des pUC18-Polylinker in das
- 5 pUC18-Plasmid (Yanisch-Perron et al. (1985) Gene 33, 103-119; erhältlich z.B. von Boehringer Mannheim) subkloniert. Sämtliche Klonierungsschritte wurden unter Verwendung gängiger molekular-biologischer Techniken und Hilfsmittel durchgeführt (z.B. Sambrook et al. (1989) supra); Restriktionsenzyme und andere
- 10 für die Klonierungen eingesetzte Enzyme wurden von Boehringer Mannheim bezogen. Der resultierende pUC-Klon (pUC-Vst1/GUS) enthält somit eine Translationsfusion des Vst1-Promotors mit dem GUS-Gen, in der die ersten fünf STS-Codons im Leserahmen über eine BamHI-Schnittstelle mit dem GUS-Gen verbunden sind.
- 15 Der Sequenzbereich des Fusionsübergangs sowie die Sequenz des Vst1-Promotors wurden mit Hilfe der enzymatischen Kettenabbruch-Methode (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467) unter Verwendung des T7-Sequencing-Kit von Pharmacia (Freiburg) auf ihre Richtigkeit überprüft.
- 20 Die Klonierung der 5'-Deletionsmutanten in dem binären Vektor pPCV002 (Koncz and Schell (1986) Mol. Gen. Genet. 204, 383-396) wird im folgenden erläutert. Dabei wurden in den meisten Fällen pUC18-Subklone als Zwischenvektoren verwendet, da das kleinere pUC-Plasmid im Vergleich zu den relativ großen binären Vektoren
- 25 leichter zu handhaben ist.

Die Plasmidbezeichnungen ergeben sich aus der ungefähren Länge des jeweiligen Promotorfragments, gerechnet vom Transkriptionsstart, der sich 73 Basenpaare entfernt vom Startkodon befindet (Hain et al. (1993) supra; Fischer (1994) supra). Die für die

30 schrittweise Verkürzung des Vst1-Promotor verwendeten Restriktionsschnittstellen sind auch in Abbildung 1 schematisch angegeben.

- p1500GUS: Das HindIII/EcoRI-Fragment, das den vollständigen STS-Promotor zusammen mit dem GUS-Gen enthält, wurde aus dem
- 35 oben beschriebenen Plasmid pUC-Vst1/GUS isoliert und zwischen die Restriktionsschnittstellen HindIII und EcoRI in den Polylinker von pPCV002 eingefügt.

- 24 -

- p1060GUS: Ein 1130 Bp-Promotorfragment wurde über die Restriktionsschnittstellen BamHI und SspI aus pUC-Vst1/GUS isoliert und in BamHI/HincII-linearisierten pUC18 kloniert (-> pUC1130). Anschließend wurde das GUS-Gen als BamHI/EcoRI-Fragment aus pUC-Vst1/GUS isoliert und zwischen die BamHI- und die EcoRI-Schnittstelle von pUC1130 kloniert. Schließlich wurde die Fusion über einen HindIII/EcoRI-Doppelverdau isoliert und über die gleichen Schnittstellen in den Polylinker von pPCV002 eingefügt.
- 10 - p930GUS: Das 1,0 kb-Promotorfragment wurde über die Restriktionsenzyme BamHI und HincII aus pUC-Vst1/GUS isoliert und über die gleichen Restriktionsschnittstellen in den Polylinker von pUC18 eingefügt (-> pUC1000). Danach erfolgte die Klonierung analog zu p1060GUS.
- 15 - p740GUS: Das ca. 1,6 kb lange HindIII/BamHI-Promotorfragment wurde aus dem Plasmid pUC-Vst1/GUS isoliert und mit dem Restriktionsenzym DraI verdaut. Das resultierende 810 Bp. lange BamHI/DraI-Fragment wurde anschließend über die Restriktionsschnittstellen BamHI und HincII in pUC18 kloniert (-> pUC810).
- 20 Anschließend wurde das GUS-Gen als BamHI/EcoRI-Fragment aus pUC-Vst1/GUS isoliert und zwischen die BamHI- und die EcoRI-Schnittstelle von pUC810 kloniert. Schließlich wurde die Fusion über einen HindIII/EcoRI-Doppelverdau isoliert und über die gleichen Schnittstellen in den Polylinker von pPCV002
- 25 eingefügt.
- p550GUS: pUC-Vst1/GUS wurde mit dem Restriktionsenzym AflII verdaut und die überhängenden 5'-Enden mit Klenow-Enzym (von Boehringer Mannheim; dNTPs ebenfalls von Boehringer Mannheim) nach Herstellerangaben aufgefüllt. Anschließend wurde mit dem
- 30 Restriktionsenzym BamHI nachgeschnitten und das entstandene 620 Bp-Promotorfragment in BamHI/HincII-linearisierten pUC18 ligiert (-> pUC620). Danach wurde die Klonierung wie u.a. für p1060GUS fortgeführt.
- p500GUS: Ein 570 Bp. langes Promotorfragment wurde über einen
- 35 BamHI/HaeIII-Doppelverdau aus pUC-Vst1/GUS isoliert und in BamHI/HincII-linearisierten pUC19-Vektor ligiert (-> pUC570). Danach erfolgte die weitere Klonierung wie zur Herstellung von u.a. p1060GUS.

- 25 -

- p430GUS: Das oben beschriebene Plasmid pUC1000 wurde unter Verwendung des Restriktionsenzym SnaBI linearisiert und mit HincII nachverdaut. Anschließend wurde der linearisierte Vektor religiert, wodurch die 500 Basenpaare des Promotors zwischen -930 und -430 deletiert wurden (-> pUC500). Die weitere Klonierung verlief wie für pUC1060GUS.
- p280GUS: pUC-Vst1/GUS wurde mit dem Restriktionsenzym BanII verdaut, die überhängenden Enden mit Klenow-Enzym aufgefüllt und der linearisierte Vektor mit dem Restriktionsenzym BamHI nachverdaut. Nach der Isolierung des 350 Bp. langen blunt end/BamHI-Promotorfragmentes wurde die Klonierung in Analogie zu p1060GUS fortgeführt.
- p140GUS: Der oben beschriebene pUC-Subklon pUC620 wurde mit den Restriktionsenzymen NsiI und PstI verdaut und der linearisierte Vektor anschließend gereinigt und religiert. Dies resultierte in der Deletion der Promotorsequenzen von -550 bis -140 (-> pUC210). Anschließend wurde das GUS-Gen als BamHI/EcoRI- Fragment aus pUC-Vst1/GUS isoliert und zwischen die BamHI- und die EcoRI-Schnittstelle von pUC1130 kloniert.
- Schließlich wurde die Fusion über einen HindIII/EcoRI-Doppolverdau isoliert und über die gleichen Schnittstellen in den Polylinker von pPCV002 eingefügt.
- p40GUS: Das 110 Bp-Promotorfragment wurde zusammen mit dem GUS-Gen durch einen NheI/EcoRI-Doppolverdau aus pUC-Vst1/GUS isoliert und das Fragment anschließend in XbaI/EcoRI-linearisierten pPCV002 kloniert.
- pΔGUS: Das Konstrukt p1500GUS wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI verdaut und der gereinigte Vektor anschließend religiert. Durch die BamHI-Schnittstelle, die der Vektor pPCV002 natürlicherweise in seiner multiplen Klonierungsstelle neben der HindIII-Schnittstelle enthält (Koncz and Schell (1986) supra) wurde auf diese Weise das gesamte Promotorfragment eliminiert.
- p35SGUS: Die Fusion des 35S RNA Promotors aus Cauliflower Mosaic Virus mit dem GUS-Gen, die als positive Kontrolle diente, wurde als HindIII-Fragment aus dem Expressionsvektor pRT99GUS (Töpfer et al. (1988) Nucleic Acids Research 16, 8725) isoliert und in die multiple Klonierungsstelle von pPCV002 eingefügt.

Beispiel 2:

Pflanzenmaterial, Pflanzentransformation und Regeneration
5 transgener Pflanzen

- Nicotiana tabacum cv. Petit Havana SR1 (Maliga et al. (1973) Nature New Biol. 244, 29-30) wurde als sterile Sproßkultur auf hormonfreiem 1/2 LS-Medium (Linsmaier and Skoog (1965) Physiol. 10 Plant 18, 100-127) mit 1% Saccharose bei 26°C, 3000 Lux und einer 16-stündigen Photoperiode kultiviert. In Abständen von 6-8 Wochen wurden Sproßabschnitte auf frisches LS-Medium umgesetzt. Für die Transformation von Blattscheiben mit Agrobacterium tumefaciens (Horsch et al. (1985) Science 227, 1229-15 1231) wurden 2-3 cm lange Blätter von sterilen Sproßkulturen in Scheiben von 1 cm Durchmesser gestanzt und mit einer Suspension von Agrobakterien (ca. 10⁹ Zellen/ml YEB-Medium), die eines der oben genannten Plasmidkonstrukte enthielten, für 5 min. inkubiert. Die infizierten Blattstücke wurden auf hormonfreies LS-20 Medium für 2-3 Tage bei 26°C gehalten. Während dieser Zeit überwuchsen die Bakterien die Blattsegmente, die anschließend in flüssigem LS-Medium ohne Hormone gewaschen und auf LS-Medium mit Kanamycin (75 µg/ml; Sigma, München), Cefotaxim (500 µl/ml; Hoechst, Frankfurt) und Benzylaminopurin (BAP, 0,5 mg/l; 25 Duchefa, Haarlem, Niederlande) gelegt wurden. Nach 2-3 Wochen waren transformierte Sprosse sichtbar, die auf hormonfreiem LS-Medium mit 75 µg/ml Kanamycin und 100 µg/ml Cefotaxim bewurzelt wurden.
- 30 Die für die Transformation der Tabakblattstücke eingesetzten Agrobakterienkulturen wurden wie folgt hergestellt. Zunächst wurden die oben beschriebenen pPCV002-Derivate in den E. coli Mobilisierungsstamm S17-1 (Simon et al. (1983) Bio/Technology 1, 784-790) eingebracht. Dabei erfolgten die Herstellung
- 35 kompetenter S17-1 E. coli-Zellen sowie die Transformation der kompetenten Zellen mit den entsprechenden Plasmiden nach Taketo (1988) Biochem. Biophys. Acta 949, 318-324 bzw. Hanahan (1983) J. Mol. Biol. 166, 557-580. Anschließend wurden der E. coli-Stamm S17-1, den jeweiligen binären Vektor enthaltend, und der

Agrobacterium tumefaciens-Stamm GV3101 C58C1 Rif^r pMP90RK (Koncz and Schell (1986) supra) in entsprechenden Medien bis zur OD₅₈₀ = 1,0 angezüchtet. Für die Anzucht der E. coli-Bakterien wurde herkömmliches YT-Medium (Miller (1972)

- 5 Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Bacto-Tryptone 0,8% (w/v), Yeast-Extract 0,5% (w/v), NaCl 0,5% (w/v), pH 7,0) bei 37 °C und für die Anzucht der A. tumefaciens-Bakterien wurde YEB-Medium (Beef-Extract 0,5% (w/v), Yeast-Extract 0,1%
10 (w/v), Bacto-Peptide 0,5% (w/v), Saccharose 0,5% (w/v), MgSO₄ 2 mM, pH 7,2) bei 28 °C eingesetzt. Für die anschließende Konjugation wurden die Bakterien bei 1500 x g für 5 min. abzentrifugiert und zweimal in frisch angesetzter 10 mM MgSO₄-Lösung gewaschen. Anschließend wurden Donor (E. coli) und
15 Akzeptor (A. tumefaciens) im Verhältnis 1:1 gemischt und auf eine YEB-Agarplatte getropft. Nach 16-stündiger Inkubation bei 28 °C wurde der Bakterientropfen mit 10 mM MgSO₄-Lösung abgespült und 10⁻²-, 10⁻³- und 10⁻⁴-Verdünnungen auf YEB-Selektionsplatten ausplattiert. Aus einer Einzelkultur wurde
20 bei 28 °C eine für die Transformation von N. tabacum verwendete Agrobakterienkultur gezüchtet.

- Die transgenen Tabaksprosse, die jeweils eine der oben beschriebenen Vst1-Promotor/GUS-Fusionen enthielten, wurden
25 steril über Sproßkultur vermehrt, teilweise in Erde überführt und im Gewächshaus unter normalen Bedingungen (22 °C, 60% relative Luftfeuchtigkeit, ca. 15.000 Lux) bis zur Blüte kultiviert. Die Blüten wurden durch Pergamenttüten vor Fremd-
bestäubung geschützt und reife Samenkapseln mit Samen der F1-
30 Generation nach 4-6 Wochen geerntet. Für biologische Tests im Gewächshaus wurde der Samen der F1-Generation auf LS-Medium mit 75 µg/ml Kanamycin ausgelegt. Dies erfolgte unter sterilen Bedingungen direkt aus der Kapsel oder nach Oberflächen-sterilisation (1. kurzes Waschen mit sterilem Wasser; 2. 2 min.
35 Inkubation in 70% Ethanol; 3. 10 min. Inkubation in 3% NaOCl (13% aktives Chlor); 4. dreimaliges Waschen mit Wasser; 5. Trocknung im Laminarstrom der Sicherheitswerkbank). Nach ca. 2-wöchiger Kultivierung auf LS-Medium mit 75 µg/ml Kanamycin bei 25-26 °C, 2000-3000 Lux und 60% Luftfeuchte waren kanamycin-

- 28 -

resistente Tabakkeimlinge und kanamycinsensitive Tabakkeimlinge eindeutig zu unterscheiden. Resistente Keimlinge zeigten im Gegensatz zu sensitiven Keimlingen ausgeprägtes Primärwurzelwachstum. Außerdem waren nur hier nach 2 Wochen neben den 5 Kotyledonen auch die Primärblätter zu erkennen. In diesem "Vierblattstadium" wurden die resistenten Fl-Keimlinge in Erde überführt, abgehärtet und unter geeigneten Bedingungen weiterkultiviert.

10

Beispiel 3:

Pflanzenanzucht, Ozonbehandlung und Blatternte

15 Für die anschließende Ozonbehandlung wurden transgene, kanamycinresistente Tabakkeimlinge zunächst von Agarplatten in Blumentöpfe mit einem 2:1-Gemisch von Standardsubstrat (Typ T / Frühstorfer / Lauterbach) mit Perlite überführt und für 3 Wochen in einer Klimakammer mit einem 12 h-Tag/Nacht-Zyklus, 15.000 20 Lux, 25 °C-Tagestemperatur, 20 °C-Nachttemperatur, 65-70% Luftfeuchte und gefilterter Luft inkubiert.

Die Tabakpflanzen wurden anschließend einem einzigen Ozonpuls für 10 h ausgesetzt und dann in Schadstoff-freier, gefilterter Luft für 2-14 h inkubiert. Sämtliche Begasungsexperimente 25 wurden in geschlossenen Plexiglas-Boxen, die in die Klimakammer gestellt wurden, unter den angegebenen Klimabedingungen durchgeführt. Die Ozon-Behandlungen begannen immer um 9.00 Uhr morgens über den Tageszyklus hinweg. Das Ozon wurde durch elektrische Entladung in trockenem Sauerstoff gewonnen. Die 30 Dosierung und Analysen wurden unter Computer-Kontrolle durchgeführt (Langebartels et al. (1991) Plant Physiol. 95, 882-889). Die Tabakblätter einer Pflanze wurden von der Spitze der Pflanze aus nach unten gezählt und in die Blattnummern 1-10 klassifiziert, wobei das 1. Blatt eine Größe von mindestens 8 35 cm aufwies. Die Tabakblätter (klassifiziert von 1-10) wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der Ozonbehandlung einzeln in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Beispiel 4: β -Glucuronidase-Aktivitätstest

5 Die fluorometrische Analyse der GUS-Enzymaktivität wurde streng nach Jefferson (1987) supra bzw. Jefferson et al. (1987) EMBO J. 6, 3901-3907 unter Verwendung von 4-Methyl-umbelliferyl-glucuronid (MUG, Sigma, München) durchgeführt. Die Konzentration des Produktes 4-Methylumbelliferon (MU) wurde mit einem
10 Fluoreszenzphotometer (Perkin Elmer LS-2 B Filterfluorimeter) in einer Quarz-Durchflußküvette gemessen. Die GUS-Aktivität in Pflanzenextrakten wurde in $\text{pmol MU} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ berechnet. Die Proteinkonzentration in den Tabakblattextrakten wurde nach Bradford (1976) Analyt. Biochem. 72, 248-254 bestimmt.

15

In parallel durchgeführten Experimente mit Ozon-behandelten Weinpflanzen und anschließenden Northern Blot Analysen konnte gezeigt werden, daß eine Begasung mit 0,2 $\mu\text{l/l}$ und 0,4 $\mu\text{l/l}$ Ozon in einer beträchtlichen Induktion der STS-Genexpression
20 auf mRNA-Ebene resultiert. Aus diesem Grund sollten STS-Gene aus Weinrebe besonders gut für die Identifizierung Ozon-responsiver DNA-Elemente geeignet sein. Es sei an dieser Stelle erwähnt, daß bislang solche Gene, die eine signifikante, zuverlässig meßbare Ozon-Induktion in Ozon-behandelten Pflanzen
25 im Vergleich zu unbehandelten Pflanzen erkennen lassen, nicht zur Verfügung stehen.

Um den Einfluß von Ozon auf Promotorebene analysieren zu können, wurden Fl-Tabakpflanzen (11 Wochen alt) der stabil
30 transformierten Tabaklinie, die die das Vst1-Promotor/GUS-Fusionskonstrukt mit der vollständigen Promotorregion (p1500GUS) enthält, in Ozonbegasungsexperimenten eingesetzt. GUS-Enzymaktivitäten wurden fluorometrisch in Rohextrakten von Blättern, die zu verschiedenen Zeitpunkten während einer 10-
35 stündigen Ozonbegasung mit verschiedenen Ozonkonzentrationen (0,1 $\mu\text{l/l}$ Ozon, 0,2 $\mu\text{l/l}$ Ozon bzw. 0,4 $\mu\text{l/l}$ Ozon) und einer 14-stündigen Postinkubationsphase in schadstofffreier Luft g erntet wurden, bestimmt. Die in Abbildung 2 dargestellten Ergebnisse zeigen einen raschen durch Ozon induzierten Anstieg

- 30 -

der GUS-Aktivität im Vergleich zu Kontrollpflanzen, die nur in schadstofffreier Luft gehalten wurden. Danach verursachte die Behandlung mit 0,1 $\mu\text{l/l}$ Ozon eine 11-fache Induktion und die Behandlung mit 0,2 bzw. 0,4 $\mu\text{l/l}$ Ozon sogar eine bis zu 25-fache Induktion der durch den STS-Promotor kontrollierten Expression des GUS-Gens 12 h nach Beginn der Ozon-Behandlung.

Für die Identifizierung von cis-regulatorischen Sequenzen, die für die beobachtete starke Ozoninduktion des STS-Promotors verantwortlich sind, wurden die transgene Tabaklinien, die die oben beschriebenen 5'-Deletionen des Vst1-Promotors in Fusion mit dem bakteriellen GUS-Reportergen enthalten, als unabhängige F0-Pflanzen in Ozonbegasungsexperimenten analysiert. Die Primärregenerate wurden für mehrere Monate in Sterilkultur kultiviert und über Sproßkultur vermehrt. Ebenso wurden F1-Tabakpflanzen (11 Wochen alt) dieser stabilen Transformanten auf Ozon-induzierte GUS-Expression untersucht.

Die transgenen Tabakpflanzen wurden für 10 h mit 0,1 $\mu\text{l/l}$ Ozon behandelt und anschließend für weitere 2 h in schadstofffreier Luft inkubiert. Die GUS-Aktivität wurde in Rohextrakten von mittelalten Blättern bestimmt und mit der Enzymaktivität in unbehandelten Kontrollpflanzen verglichen. Die Ergebnisse der fluorometrischen Analyse der GUS-Enzymaktivitäten sind in Tabelle 1 dargestellt. Während die GUS-Aktivität mit zunehmender Verkürzung der Promotorregion von -1500 auf -430 sowohl in Ozon-behandelten Testpflanzen als auch in unbehandelten Kontrollpflanzen in einer leichten Abnahme der Ozon-Induktion resultiert (Induktionsfaktor sinkt von ca. 12 (-1500) auf ca. 10 (-430)), bewirkt die zusätzliche Deletion des Promotorbereichs zwischen -430 und -280 eine drastische Reduktion der GUS-Expression in Ozon-behandelten Testpflanzen. Während Pflanzen, in denen das GUS-Gens unter Kontrolle des -430-5'-Deletionspromotors steht, eine 10-fache Ozon-Induktion gegenüber den Kontrollpflanzen zeigen, ist in Pflanzen, in die Expression des GUS-Gens durch den kürzeren -280-5'-Deletionspromotor kontrolliert wird, lediglich eine maximal 2-fache Induktion der GUS-Expression durch Ozon zu beobachten. Demzufolge enthält der Promotorbereich des Vst1-Gens aus

- 31 -

Weinrebe, der die Basenpaare -430 bis -280 umfaßt cis-aktive Elemente, die für eine ausgeprägte Ozon-induzierte Expression d s STS-Gens essentiell sind.

5 Diese Ergebnisse wurden in Pflanzenzellen, die die obigen Konstrukte enthalten und in pflanzlichen Zellkulturen gezüchtet wurden, bestätigt.

10

15

20

25

30

35

ABBILDUNGEN und TABELLEN**Abbildung 1:**

5 Restriktionskarte der Vst1-Promotor/GUS-Translationsfusion in dem Plasmid pUC-Vst1/GUS. Das Plasmid enthält eine Translationsfusion des Vst1-Promotors aus der Weinrebe mit dem GUS-Gen aus E. coli. Die für die Klonierung der 5'-Deletionsmutanten benutzten Restriktionsschnittstellen sind
10 eingezeichnet. nos ter = Terminationssignal des Nopalinsynthasegens aus Agrobacterium tumefaciens.

Abbildung 2:

Kinetik der durch den Vst1-Promotor kontrollierten Induktion
15 der GUS-Expression in transgenen F1-Tabakpflanzen, die eine Translationsfusion des GUS-Gens mit dem vollständigen Vst1-Promotor aus Weinrebe enthalten (p1500GUS), durch verschiedene Ozonkonzentrationen.

Die GUS-Aktivitäten wurden fluorometrisch in Rohextrakten von
20 Tabakblättern (Blatt-Nr. 4) nach Jefferson (1987), supra, bestimmt. Die verschiedenen Erntezeitpunkte ergeben sich aus der Abbildung. Nach der 10-stündigen Ozonbehandlung erfolgte eine 14-stündige Postinkubation der Tabakpflanzen in schadstofffreier Luft. Kontrollpflanzen wurden nur in schadstoff-
25 freier Luft (ohne Ozonbegasung) gehalten. n = 3 oder 4; Mittelwerte \pm Standardfehler; sämtliche Tests wurden als Doppelversuche durchgeführt.

Tabelle 1:

30 GUS-Enzymaktivitäten wurden fluorometrisch in Proteinextrakten von mittelalten Blättern von Ozon-behandelten (+) und unbehandelten (-) unabhängigen Tabaktransformanten bestimmt. Die transgenen Tabaklinien enthalten verschiedene 5'-Deletionen des Vst1-Promotors in Fusion mit dem bakteriellen GUS-
35 Reportergen. F0-Transformanten und F1-Pflanzen (11 Wochen alt) wurden für 10 h mit 100 nl/l Ozon begast und anschließend für 2 h in schadstofffreier Luft postinkubiert. Mittelwerte \pm Standardfehler; sämtliche Analysen wurden als Doppelversuche durchgeführt.

5	Vst1-Promotor 5'-deletiert bis Position	untersuchte unabhängige, transgene Tabaklinien	GUS-Enzymaktivität (pmol MU min ⁻¹ mg ⁻¹ Protein)		Induktions- faktor
			+ Ozon	- Ozon	
10	-1500	1(F1)	735 ± 100	63 ± 7	11.7
	-740	2(F1)	388 ± 59	30 ± 5	12.9
	-550	3(F0)	126 ± 13	12 ± 3	10.5
15		2(F1)	173 ± 25	15 ± 3	11.5
	-500	5(F0)	148 ± 52	15 ± 6	9.9
	-430	6(F0)	141 ± 38	14 ± 4	10.0
20	-280	6(F0)	22 ± 4	13 ± 3	1.7
		2(F1)	30 ± 3	15 ± 3	2.0
	-140	2(F0)	12 ± 0.2	8 ± 3	1.5
25		3(F1)	24 ± 3	15 ± 3	1.6
	-40	3(F1)	24 ± 2	15 ± 3	1.6
	+70	1(F1)	3.5 ± 1	3.5 ± 1	1.0

30 Tabelle 1

35

Tabelle 1:

GUS-Enzymaktivitäten wurden fluorometrisch in Proteinextrakten von mittelalten Blättern von Ozon-behandelten (+) und unbehandelten (-) unabhängigen Tabaktransformanten bestimmt.

Die transgenen Tabaklinien enthalten verschiedene 5'-Deletionen des Vst1-Promotors in Fusion mit dem bakteriellen GUS-Reportergen. F0-Transformanten und F1-Pflanzen (11 Wochen alt) wurden für 10 h mit 100 nl/l Ozon begast und anschließend für 2 h in schadstofffreier Luft postinkubiert. Mittelwerte \pm Standardfehler; sämtliche Analysen wurden als Doppelversuche durchgeführt.

Vst1-Promotor 5'-deletiert bis Position	untersuchte unabhängige, transgene Tabaklinien	GUS-Enzymaktivität (pmol MU min ⁻¹ mg ⁻¹ Protein)		Induktions- faktor
		+ Ozon	- Ozon	
-1500	1(F1)	735 \pm 100	63 \pm 7	11.7
-740	2(F1)	388 \pm 59	30 \pm 5	12.9
-550	3(F0)	126 \pm 13	12 \pm 3	10.5
	2(F1)	173 \pm 25	15 \pm 3	11.5
-500	5(F0)	148 \pm 52	15 \pm 6	9.9
-430	6(F0)	141 \pm 38	14 \pm 4	10.0
-280	6(F0)	22 \pm 4	13 \pm 3	1.7
	2(F1)	30 \pm 3	15 \pm 3	2.0
-140	2(F0)	12 \pm 0.2	8 \pm 3	1.5
	3(F1)	24 \pm 3	15 \pm 3	1.6
-40	3(F1)	24 \pm 2	15 \pm 3	1.6
+70	1(F1)	3.5 \pm 1	3.5 \pm 1	1.0

- 35 -

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: GSF - Forschungszentrum fuer Umwelt und
Gesundheit GmbH
(B) STRASSE: Ingolstaedter Landstr. 1
(C) ORT: Oberschleissheim
(E) LAND: Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: 85764

(A) NAME: Bayer AG
(B) STRASSE: Bayerwerk
(C) ORT: Leverkusen
(E) LAND: Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: 51368

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Ozon-Induzierte Genexpression in
Pflanzen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 3

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRAEGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LAENGE: 161 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Doppelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

ACTTTTCGAG CCCCTTGAAC TGGAAATTAA TACATTTTCC ACTTGACTTT TGAAAAGGAG	60
GCAATCCCAC GGGAGGGAAG CTGCTACCAA CCTTCGTAAT GTTAATGAAA TCAAAGTCAC	120
TCAATGTCCG AATTTCAAAC CTCANCAACC CAATAGCCAA T	161

- 36 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LAENGE: 33 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Sonstige Nucleinsaeure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

CCCCAAGCTT CCCC GGATCA CATTCTATG AGT

33

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LAENGE: 34 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Sonstige Nucleinsaeure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

CGCGGATCCT CAATTGAAGC CATTGATCCT AGCT

34

ANSPRÜCHE

5

1. Die pflanzliche DNA-Sequenz:

ACTTTTCGAG CCCCTTGAAC TGGAAATTAA TACATTTTCC ACTTGACTTT
TGAAAAGGAG GCAATCCCAC GGGAGGGAAG CTGCTACCAA CCTTCGTAAT
GTTAATGAAA TCAAAGTCAC TCAATGTCCG AATTTCAAAC CTCANCAACC

10 CAATAGCCAA T.

2. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1, die aus Weinrebe (Vitis vinifera) stammt.

15 3. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder 2, die in dem Stilbensynthase-Gen Vst1 natürlicherweise enthalten ist und den Basenpaaren -270 bis -430 entspricht.

20 4. Promoterregion des Stilbensynthasegens Vst1 aus Weinrebe, der mindestens die DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 fehlt.

5. Promoterregion gemäß Anspruch 4, die nur den Sequenzbereich vom Translationsstart bis Basenpaar -270 umfaßt.

25

6. Promoterregion gemäß Anspruch 4 oder 5, die noch eine Pathogen-induzierte Genexpression in Pflanzenzellen vermittelt.

30 7. Chimäre Nukleinsäuremoleküle, in die die DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens ein Fragment davon eingeführt wurde.

8. Chimäre Nukleinsäuremoleküle gemäß Anspruch 7, die eine Ozon-induzierbare Expression der in ihnen enthaltenen 35 kodierenden Regionen in Pflanzen ermöglichen.

9. Vektoren, welche die DNA-Sequenz, eine Promoterregion oder ein chimäres Nukleinsäuremolekül gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, oder T il davon enthalten.

10. Transgene Pflanzen, die die DNA-Sequenz, eine Promoterregion oder ein chimäres Nukleinsäuremoleküle gemäß einem der vorangehenden Ansprüche oder eine davon abgeleitete DNA-Sequenz enthalten, sowie Teile dieser Pflanzen und deren Vermehrungsmaterial, wie Protoplasten, Pflanzenzellen, Kalli, Samen, Knollen oder Stecklinge, usw., sowie die Nachkommen dieser Pflanzen.

11. Transgene Pflanzen, die aufgrund des Fehlens der (im natürlichen Zustand vorhandenen) DNA-Sequenz
ACTTTTCGAG CCCCTTGAAC TGGAAATTAA TACATTTTCC ACTTGACTTT
TGAAAAGGAG GCAATCCCAC GGGAGGGAAG CTGCTACCAA CCTTCGTAAT
GTTAATGAAA TCAAAGTCAC TCAATGTCCG AATTTCAAAC CTCANCAACC
CAATAGCCAA T
oder aufgrund des Fehlens mindestens eines Fragmentes davon keine Ozon-induzierbare Expression des natürlicherweise Ozon-induzierbaren Gens mehr aufweisen.

12. Pflanzen gemäß Anspruch 11, in denen die Ozon-induzierbare Expression von Krankheitsresistenzgenen stark reduziert ist.

13. Pflanzen gemäß Anspruch 11 oder 12, in denen die Ozon-induzierbare Expression von Stilbensynthasegenen, insbesondere des Vst1-Gens aus Weinrebe stark reduziert ist.

14. Pflanzen gemäß Anspruch 10, in denen aufgrund der Einführung der DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens eines Fragmentes davon eine Ozon-induzierbare Genexpression eines natürlicherweise nicht über diese DNA-Sequenz verfügenden Gens stattfinden kann.

15. Pflanzen gemäß Anspruch 14, in denen Ozon-induzierbare Expression von solchen Genen stattfinden kann, deren Genprodukte in Pflanzenzellen in der Lage sind, reaktive Sauerstoffspezies zu entgiften.

16. Pflanzen gemäß Anspruch 14 oder 15, in denen Ozon-induzierbare Expression von Katalase- oder Superoxiddismutase-Genen stattfinden kann.

5 17. Pflanzen gemäß Anspruch 14, in denen Ozon-induzierbare Expression von Reportergenen stattfinden kann.

18. Dikotyle Pflanzen gemäß einem der Ansprüche 10 bis 17, insbesondere Nutzpflanzen, wie Sojabohne, Raps, Tomate,
10 Zuckerrübe, Kartoffel, Baumwolle, Tabak, sowie Zierpflanzen oder Bäume.

19. Monokotyle Pflanzen gemäß einem der Ansprüche 10 bis 17, insbesondere Getreide wie Hafer, Weizen, Roggen, Gerste,
15 Reis, Hirse oder Mais.

20. Transgene Pflanzenzellen, einschließlich Protoplasten, die die DNA-Sequenz, eine Promoterregion oder ein chimäres Nukleinsäuremoleküle gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9
20 oder eine davon abgeleitete DNA-Sequenz enthalten.

21. Pflanzenzellen, einschließlich Protoplasten, die aufgrund des Fehlens der (im natürlichen Zustand vorhandenen) DNA-Sequenz

25 ACTTTTCGAG CCCCTTGAAC TGGAAATTAA TACATTTTCC ACTTGACTTT
TGAAAAGGAG GCAATCCCAC GGGAGGGAAG CTGCTACCAA CCTTCGTAAT
GTTAATGAAA TCAAAGTCAC TCAATGTCCG AATTTCAAAC CTCANCAACC
CAATAGCCAA T

oder aufgrund des Fehlens mindestens eines Fragmentes davon
30 keine Ozon-induzierbare Expression des natürlicherweise Ozon-induzierbaren Gens mehr aufweisen.

22. Pflanzenzellen gemäß Anspruch 20, in denen aufgrund der Einführung der DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens
35 eines Fragmentes davon eine Ozon-induzierbare Genexpression eines natürlicherweise nicht über diese DNA-Sequenz verfügenden Gens stattfinden kann.

23. Verfahren zur Erzeugung transgener Pflanzen bzw. Pflanzenzellen, in denen die Ozon-induzierbare Expression von natürlicherweise Ozon-induzierbaren Abwehrgenen durch Deletion der DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens eines
5 Fragmentes davon in dem Abwehrgen, das diese DNA-Sequenz oder eine davon abgeleitete DNA-Sequenz natürlicherweise enthält, stark reduziert bzw. ausgeschaltet wird.

24. Verfahren gemäß Anspruch 23, in denen die Ozon-
10 induzierbare Expression von Stilbensynthasegenen stark reduziert bzw. ausgeschaltet wird.

25. Verfahren gemäß Anspruch 23 oder 24, in denen die Ozon-induzierbare Expression des Vst1-Gens aus Weinrebe stark
15 reduziert bzw. ausgeschaltet wird.

26. Verfahren zur Erzeugung transgener Pflanzen bzw. Pflanzenzellen, in denen ein oder mehrere Gene, deren Expression natürlicherweise nicht oder nicht wesentlich durch
20 Ozon induziert wird, aufgrund der Einführung der DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens eines Fragmentes davon durch Ozon induzierbar sind.

27. Verfahren gemäß Anspruch 26, in denen ein oder
25 mehrere Katalase- und/oder Superoxiddismutase-Gene durch Ozon induzierbar sind.

28. Verfahren gemäß Anspruch 26, in denen ein oder mehrere Reportergene durch Ozon induzierbar sind.
30

29. Verfahren zur Beseitigung der Ozon-Induzierbarkeit von natürlicherweise Ozon-induzierbaren Abwehrgenen, die die DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder eine davon abgeleitete DNA-Sequenz natürlicherweise enthalten, durch Deletion oder
35 Inaktivierung der DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens eines Fragmentes davon.

30. Verfahren gemäß Anspruch 29, in dem das Gen ein Stilbensynthase-Gen ist.

31. Verfahren gemäß Anspruch 29 oder 30, in dem das Gen das Vst1-Gen aus Weinrebe ist.

32. Verfahren zur Erzeugung von Ozon-induzierbarer Merkmalsausprägung in transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen durch Einfügen der DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens eines Fragmentes davon in solche Gene, die natürlicherweise nicht oder nicht wesentlich durch Ozon induzierbar sind.

10 33. Verwendung der DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder eines Fragmentes davon zur Auffindung Ozon-responsiver Sequenzbereiche in pflanzlichen Genen.

15 34. Verwendung der DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder eines Fragments davon zur Erzeugung ozon-induzierbarer Merkmalsausprägung in transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen.

35. Verwendung der DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder eines Fragments davon zur Erzeugung von Pflanzen gemäß Anspruch 20 17, die als Biomonitoren zur quantitativen und/oder qualitativen Bestimmung von Ozon-Konzentrationen eingesetzt werden können.

36. Verwendung der Promotorregion gemäß einem der 25 Ansprüche 4 bis 6 zur Erzeugung erhöhter pathogen- aber nicht ozon-induzierbarer Krankheitsresistenz in transgenen Pflanzen.

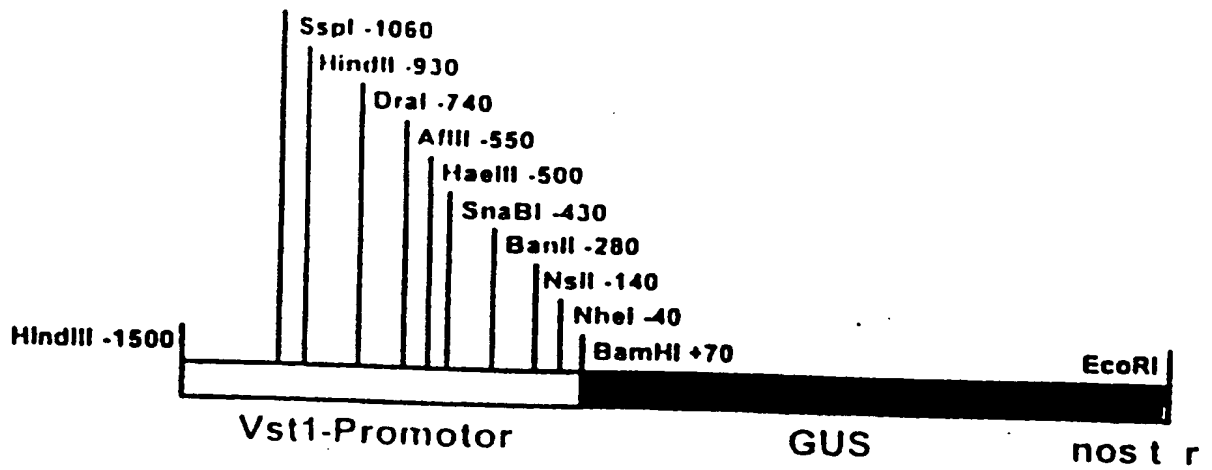


Abbildung 1

2/2

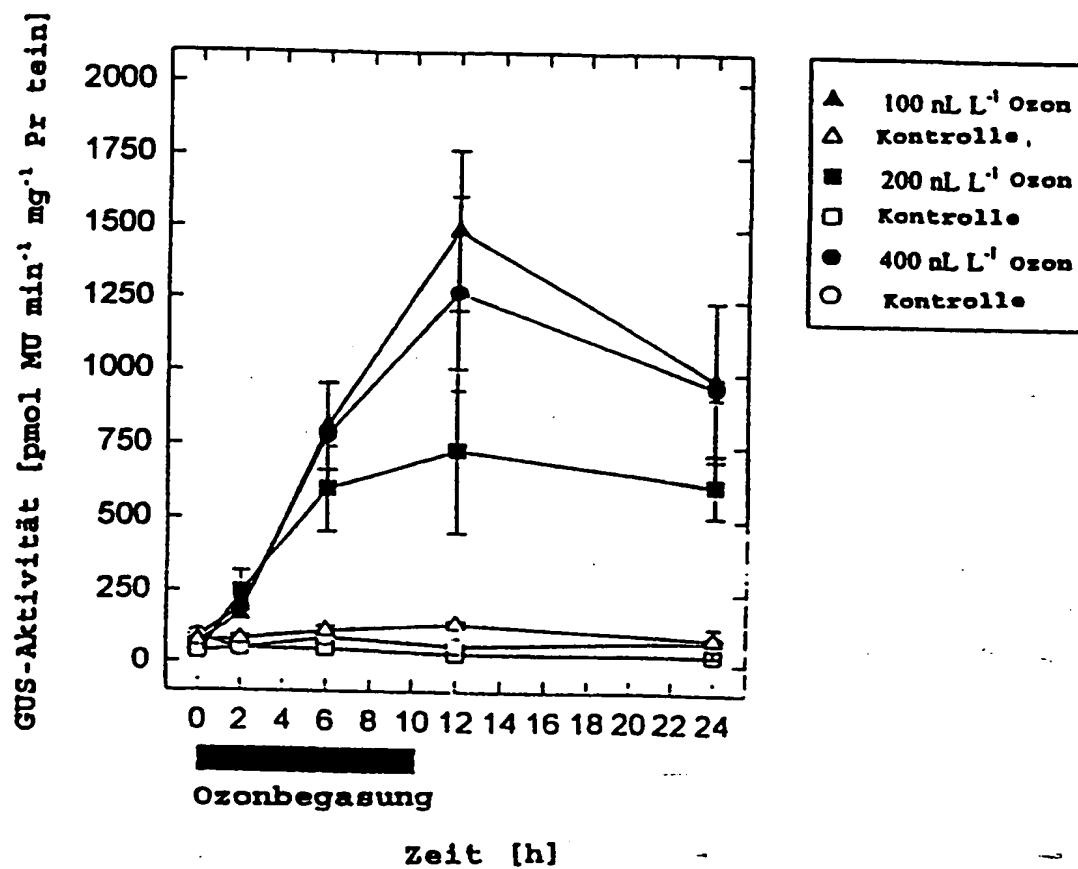


Abbildung 2